

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 53 664.3

Anmeldetag: 18. November 2002

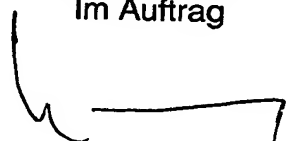
Anmelder/Inhaber: Dr. Gisela Gauchel,
Reichshof/DE

Bezeichnung: Markersubstanzen und ihre Verwendung in
Diagnoseverfahren

IPC: A 61 K, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Hoiß

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)
BEST AVAILABLE COPY

9153 III/os

Dr. Gisela GAUCHEL
Im freien Feld 22
D-51580 Reichshof/Wildberg

Markersubstanzen und ihre Verwendung in Diagnoseverfahren

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Markersubstanzen und ihre Verwendung in Diagnoseverfahren.

Zur Therapie drogensüchtiger Patienten sind die sog. Methadon- und Heroinprogramme eingeführt worden. Den an ihnen teilnehmenden Probanden ist der Konsum anderer illegaler Drogen bzw. Betäubungsmittel untersagt, strenge Kontrollen des sog. Beigebrauchs im Urin sind gesetzlich vorgeschrieben. Vor allem der Beigebrauch von Opiaten und Cocain muss zur Abschätzung des Substitutionsbedarfes bekannt sein [S.T. Chermack et al., Drug Alcohol Depend 59 (2000) 43-49]. Ständiger Beigebrauch gefährdet das Behandlungsziel der völligen Drogenabstinenz, welches Vermeidung akuter Entzugssymptomatik, Verhinderung opiatassoziierter Todesfälle, Reduzierung des Infektionsrisikos mit HI- und Hepatitisviren, Schutz der Bevölkerung vor Beschaffungskriminalität, Resozialisierung und berufliche Reintegration beinhaltet. Vor allem wegen der steigenden Zahl methadonassoziierter Todesfälle [Die Beauftragte der Bundesregierung. Sucht- und Drogenbericht 2001. Bundesministerium für Familie und Gesundheit, Berlin, April 2002] kann nachgewiesener häufiger Beigebrauch zum gesetzlich vorgeschriebenen Ausschluss aus dem jeweiligen Substitutionsprogramm führen [Bundesausschuß.

der Ärzte und Krankenkassen: Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen zur substitutionsgestützten Behandlung Opiatabhängiger. Köln, 1999]. Daher besteht seitens der Drogensüchtigen ein großes Interesse, falsch - negative Resultate bei der Drogenanalytik im Urin zu erzielen. Üblicherweise lässt sich das durch exzessives Trinken zwecks starker Verdünnung des Urins, durch Zumischung präanalytischer Störsubstanzen mit hohem Verfälschungspotential [S.L. Mikkelsen et al., Clin. Chem. 34 (1988) 2333 - 2336] oder durch Austausch des eigenen Urins gegen einen käuflich erwerbbaaren methadonhaltigen aber drogenfreien erreichen. Jedes neue Drogennachweisverfahren wird sofort durch Gegenmaßnahmen aus der Drogenszene konterkariert. Der Wettstreit zwischen Scene und Analytik lässt sich durch einschlägige Publikationen in Zeitschriften wie "High Times" belegen und verfolgen. Eine Aufgabe der Drogenanalytik besteht darin, diese mit Ideenreichtum und hohem Wissenstand durchgeführten Verfälschungen und Täuschungsmanöver zu erkennen und möglicherweise unwirksam zu machen.

DE 101 12470 A1 beschreibt ein Verfahren der endogenen Markierung von Säugetieren, das die eindeutige Zuordnung einer Körperflüssigkeit, eines Sekretes, einer Gewebeprobe oder eines Exkrementes zu einem Individuum ermöglichen soll. Es besteht in der oralen oder parenteralen Gabe von nur geringfügig bzw. nicht metabolisierbaren Substanzen und deren anschließenden analytischen Nachweis als solche oder in Form ihrer Metaboliten in oben genannten Probenmaterialien. Dieses Konzept hat sich bereits in der klinischen Routine mit Polyethylenglycol (PEG) - Markern zur Überwachung drogenabhängiger Probanden unter Methadonsubstitutionstherapie gut bewährt. Die Probanden trinken 100 ml der mit Markersubstanzen versetzten Methadontrinklösung und liefern nach einer Wartezeit von 30 bis 60 Minuten ihren Urin ab. Dieser wird zentrifugiert und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie auf Nucleosil C18, 3µm, 125 mm x 4,6 mm ID mit einem Methanol - Wasser Gemisch (44% / 56%) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml/min analysiert. Die Probenvorbereitung erfolgt automatisch online mittels column - switching auf Nucleosil C18 5µm, 60 mm x 4.6 mm ID, die Charakterisierung der Marker im Eluat mittels Brechungsindex - Detektion (RID).

Auch dieses Verfahren der endogenen Markierung ist manipulationsanfällig. Es wird von den Probanden der Methadonambulanzen unwirksam gemacht, indem diese Reste der Trinklösung in drogenfreien Urin spucken bzw. einen im Mund mit Trinklösung getränkten Wattebausch in begebrauchsfreien Urin ausdrücken.

5

Hier setzt die Erfindung ein. Es liegt dementsprechend der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Diagnoseverfahren und hierfür eingesetzte Markersubstanzen bereitzustellen, durch welche sich Manipulationen im Rahmen der endogenen Markierung aufdecken lassen. Sie sollen vorteilhaft keine zusätzliche Belastung der Probanden darstellen und darüber hinaus keine zusätzlichen Material- und Personalkosten verursachen.

10

Gelöst wird diese Aufgabe durch das Diagnoseverfahren gemäß Anspruch 1 sowie die in den Unteransprüchen angegebenen Markersubstanzen.

15

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, bei welchem einem Probanden eine Markersubstanz zugeführt wird, die in einer Körperausscheidung diagnostizierbar ist, wird der dem Probanden zugeführten Substanz zusätzlich eine metabolisierbare Substanz beigegeben.

20

Die dem Probanden zusätzlich zugeführten Markersubstanzen metabolisieren im Körper, so daß sie in den Körperausscheidungen, wie Urin, nicht mehr vorhanden sind. Bei einem Versuch des Probanden, durch Spucken in den Urin die Zuordnung zu manipulieren, läßt sich die Markersubstanz dort nachweisen, so daß sich eine Manipulation sicher verhindern läßt. Aus diesem Grunde ist der Term „Spuckmarker“ eine treffende Charakterisierung.

25

Wenn also der Trinklösung metabolisierbare Substanzen als Spuckmarker zuge-mischt werden, die üblicherweise in Urinen nicht vorhanden sind, läßt deren Nachweis dort ein Täuschungsmanöver sicher erkennen.

30

Zwar erwähnt die DE 101 12 470 A1, daß Proben aus Speichel genommen werden können. Aber die dort beschriebene Probenahme dient der Identifizierung illegal aufgenommener Substanzen sowie der Zuordnung der Probe zu einem Indivi-

duum und kann nicht den Nachweis auf Täuschungsabsichten hinsichtlich der Probenzuordnung erbringen.

5 Ideale Spuckmarker sind metabolisierbare Substanzen, die als Lebensmittel- und Arzneimittelzusätze zugelassenen sind. Sie sind nach oraler Aufnahme normalerweise nicht in intakter Form im Urin vorhanden. Eine Verfälschungsabsicht bezüglich des Analysenergebnisses liegt vor, wenn die als "Spuckmarker" eingesetzte Substanz in der Markeranalyse im Urin nachgewiesen wird.

10 Vorteilhafte Spuckmarkersubstanzen sind in der Trinklösung leicht löslich. Sie besitzen bei den erforderlichen Konzentrationen keine pharmakologische Wirkung, keine auffällige Farbe und keinen intensiven Geschmack. Sie verhalten sich chromatographisch ähnlich wie die verwendeten PEG - Marker.

15 Geeignete Spuckmarkersubstanzen sind durch die in klinisch chemischen Laboratorien etablierten Analysen- und Detektionsverfahren leicht nachweisbar.

20 Mögliche Spuckmarkersubstanzen sind alle Benzoesäure- und 4-Hydroxybenzoesäurederivate vor allem deren Alkylester, Essig-, Fett-, Milch- und Weinsäureester des Glycerols, Propylenglycolester der Fettsäuren, Mono- und Diglyceride der Speisefettsäuren, Zuckerester der Fettsäuren, Butylhydroxyanisol und -toluol, Hexamethylentetramin, Aminosäuren, Aminosäureester und alle Xanthinderivate.

25 Bevorzugte Markersubstanzen sind die als Konservierungsmittel zugelassenen sog. Nipa - Ester Methyl-, Ethyl-, und Propyl-4-hydroxybenzoat. Die Methadontrinklösung muss konserviert werden, und wenn die o.g. Konservierungsmittel benutzt werden, kommt es zu keiner zusätzlichen Belastung der Probanden und keinen zusätzlichen Kosten. Von den o.g. Konservierungsmitteln ist Methyl - 4 - hydroxybenzoat (MHB) am geeignetsten, da die chromatographischen Eigenschaften dieser Substanz sehr ähnlich denen der PEG - Marker sind. Es wird zusammen mit den PEG - Markern von der Säule eluiert, zusätzliche Analysenschritte
30 sind nicht erforderlich.

Methyl-4-hydroxybenzoat, auch als Methylparaben und Nipagin-M[®] bezeichnet, ist unter der Nummer E 218 als Lebensmittel- und Arzneimittelzusatzstoff zugelassen.

sen (Rote Liste). Es wird vor allem zur Konservierung pharmazeutischer Zubereitungen wie Augentropfen, Salben und Emulsionen verwendet und ist wegen seiner geringen Toxizität zur Konservierung von Lebensmitteln zugelassen.

- 5 Neben der Anwendung in Methadonambulanzen können "Spuckmarker" im Rahmen der endogenen Markierung in allen Bereichen der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden, in denen ein Interesse besteht, die Herkunft von Proben in betrügerischer Absicht verschleiern zu wollen und in denen die Möglichkeit besteht, Proben mit der Markersubstanz zu kontaminieren. Alle in der Offenlegungsschrift DE 101 12470 A1 täuschungsbereiten Kollektive sind auf diese Weise kontrollierbar. Beispiele sind u.a. Dopingkontrolle im Leistungssport und im Tierwettkampf, Überwachung des Straßenverkehrs und des Personentransportes, Überwachung der anhaltenden Drogenfreiheit zur Wiedererlangung der Fahrerlaubnis, Einstellungsuntersuchungen (Reagan Erlass), personalärztliche Untersuchungen
- 10
- 15 und veterinärmedizinische Kontrollen.

Die Analyse der Spuckmarker erfolgt im Rahmen der endogenen Markierung zusammen mit den PEG - Markern mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und anschließender RI - Detektion. Methyl - 4 - hydroxybenzoat besitzt nur einen kleinen Brechungsindex, aber einen ausreichend guten Absorptionskoeffizienten bei 256 nm. Wird ein UV - Detektor in Serie mit dem RI - Detektor geschaltet, kann die Belastung der Probanden um einen Faktor >10 vermindert werden. Alle Markersignale im Chromatogramm werden über die aus Standard- und Referenzchromatogrammen ermittelten Retentionszeiten ausgewertet.

20

25

Beispiel

An einem Beispiel soll erklärt werden, wie, wenn die endogene Markierung zur Anwendung kommt, Täuschungsmanöver verhindert werden.

30

Einem Probanden werden 100 ml Methadontrinklösung verabreicht, die 1 - 3 g PEG - Markergemisch enthält und mit 0.01 % (10 mg/100 ml) Methyl - 4 - hydroxybenzoat konserviert ist. Die Analyse wird entsprechend der in Offenlegungsschrift DE 101 12470 A1 enthaltenen Vorschrift durchgeführt. Nach 30 - 60 Minu-

ten liefert der Proband seinen Urin ab. Zusätzlich wird das Eluat nach der Passage des RI - Detektors von einem in Serie geschalteten UV - Detektor bei $\lambda = 256 \text{ nm}$ gemessen. Es entsteht ein Chromatogramm, in dem das charakteristische RID - Profil der verabreichten PEG - Marker mit der Aufzeichnung des UV - Detektors überlagert ist.

Zeichnet der UV - Detektor nur eine Basislinie im Retentionsbereich des Spuckmarkers auf und identifiziert der RI - Detektor die verabreichte Markerzusammensetzung, kann die Urinprobe eindeutig dem betreffenden Probanden zugeordnet werden. Enthält das UV - Chromatogramm dagegen zur Retentionszeit des Spuckmarkers einen Peak, kann davon ausgegangen werden, dass der Proband mit vorsätzlicher Täuschungsabsicht beigebrauchsfreien Urin mit Markersubstanz versetzt hat.

Beigefügt sind zwei Chromatogramme gemäß Fig. 1 und 2, und zwar eines für den Spuckmarker Methyl - 4 - hydroxybenzoat allein (Fig. 1) und ein zweites gemeinsam mit der Markersubstanz PEG 300 (Fig. 2).

Wenn monodisperse PEG - Fraktionen als Markersubstanzen zum Einsatz kommen, ist es hinsichtlich der Analysengeschwindigkeit vorteilhaft, das chromatographische System zu ändern. Werden kürzerkettige PEGs mit kürzeren Permeationszeiten bevorzugt, sollte die Analyse auf Nucleosil 300-C4 $5\mu\text{m}$, $125 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm ID}$ mit 33 % CH_3OH / 67 % H_2O durchgeführt werden. Andernfalls führt die längere Verweilzeit des MHB auf der stationären Phase zu verlängerten Analysenzeiten.

5

Patentansprüche

1. Diagnoseverfahren, bei welchem einem Probanden eine Markersubstanz zugeführt wird, die in einer Körperausscheidung diagnostizierbar ist, dadurch gekennzeichnet,

10 daß der dem Probanden zugeführten Substanz zusätzlich eine metabolisierbare Substanz beigegeben wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der zusätzlich beigegebenen Substanz um lebensmittelrechtlich zulässige Materialien handelt.

3. Markersubstanz zur Verwendung in Diagnoseverfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine metabolisierbare Substanz handelt, die mit anderen Markersubstanzen im Chromatogramm nachweisbar ist.

20 4. Markersubstanz gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Substanz um Methyl - 4 - hydroxybenzoat handelt.

5. Markersubstanz gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Substanz um Benzoesäure- und 4 - Hydroxybenzoesäurederivate sowie deren Alkylester handelt.

6. Markersubstanz gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Substanz um Fettsäurederivate, wie die Mono- und Diglyceride der Speisefettsäuren sowie die Zuckerester der Fettsäuren handelt.

30 7. Markersubstanz gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Substanz um Glycerolderivate, z.B. die entsprechenden Ester der Essig-, Milch- und Weinsäure, sowie die der Fettsäuren handelt.

35

21.11.03

8. Markersubstanz gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Substanz um Aminosäuren und Aminosäurederivate handelt.
- 5 9. Markersubstanz gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Substanz um Xanthinderivate handelt.

Zusammenfassung

Es werden ein Diagnoseverfahren sowie Markersubstanzen beschrieben, über welche sich Manipulationen im Rahmen der endogenen Markierung aufdecken und somit verhindern lassen. Dabei wird zusätzlich zu nichtmetabolisierbaren Markersubstanzen eine metabolisierbare Substanz beigegeben, bei deren Nachweis in der Körperausscheidung eine Manipulation zutage tritt.

21.11.03

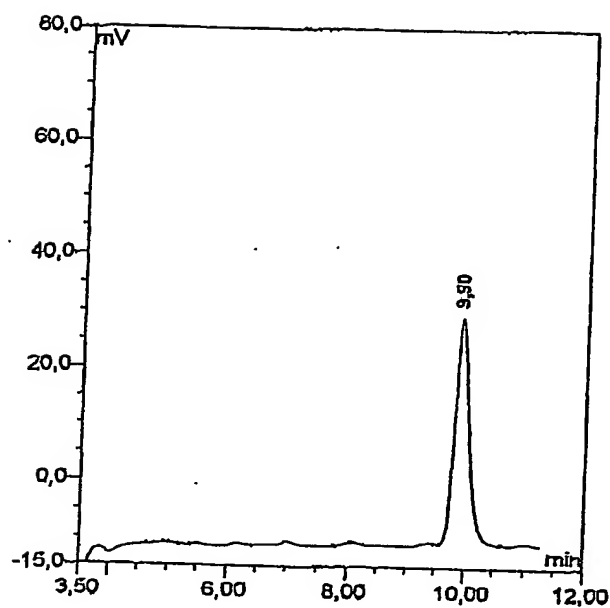


Fig. 1

Methyl-4-hydroxybenzoat

Nucleosil 300-C4 5 μ m, 125x4.8 mm, 33 % CH₃OH/67 % H₂O, 0.5 ml/min.

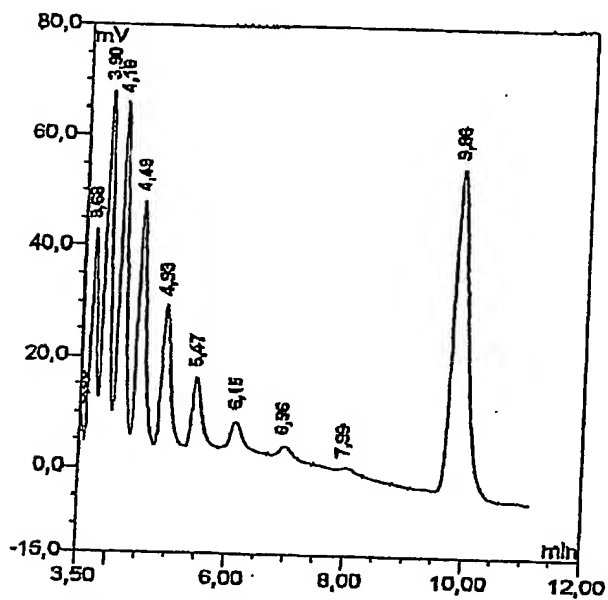


Fig. 2

PEG 300 + Methyl-4-hydroxybenzoat

Nucleosil 300-C4 5 μ m, 125x4.6 mm, 33 % CH₃OH/67 % H₂O, 0.5 ml/min